

# PRODUCTION OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE FROM LACTIC MATERIAL

**Publication number:** JP5202098

**Publication date:** 1993-08-10

**Inventor:** UCHIDA TOSHIAKI; SATO KAORU; KAWASAKI ISAHIRO; DOSEMARI SHUNICHI

**Applicant:** SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

**Classification:**

**- international:** *A23J1/20; C07K1/18; C07K14/79; C12N9/08; C12N9/52; A23J1/00; C07K1/00; C07K14/435; C12N9/08; C12N9/52; (IPC1-7): A23J1/20; A23K1/16; A23K1/165; A61K7/00; A61K37/14; A61K37/50; A61K39/395; C07K3/20; C07K15/14; C12N9/08*

**- european:** A23J1/20; C07K1/18; C07K14/79; C12N9/08; C12N9/52

**Application number:** JP19920036915 19920129

**Priority number(s):** JP19920036915 19920129

**Also published as:**



EP0556083 (A1)  
EP0556083 (B1)  
AU661090 (B2)

**Report a data error here**

## Abstract of **JP5202098**

**PURPOSE:**To obtain high-purity lactoperoxidase, secretive components and lactoferrin in high yield in a simple operation. **CONSTITUTION:**A lactic stock including lactoperoxidase, secretive components and lactoferrin is brought into contact with a cation exchange element to effect adsorption of these components thereto. Thence, these components are successively separated and eluted with respective aqueous solutions or buffer solutions differing in ionic strength and pH value from one another, thus obtaining the objective lactoperoxidase, secretive components and lactoferrin.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

計 4 頁

特開平5-202098

(43) 公開日 平成 5 年(1993) 8 月 10 日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C07K 15/14		7731-4H		
A23J 1/20		7236-4B		
A23K 1/16	303	F 9123-2B		
1/165		C 9123-2B		
A61K 7/00		K 9165-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平4-36915	(71) 出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号
(22) 出願日	平成 4 年(1992) 1 月 29 日	(72) 発明者	内田 俊昭 埼玉県川越市新宿町 5-11-3 雪印寮
		(72) 発明者	佐藤 薫 埼玉県上福岡市中央 2-9-10 カーサ中 央 204
		(72) 発明者	川崎 功博 埼玉県川越市笠幡 4881-21
		(72) 発明者	堂迫 俊一 埼玉県浦和市北浦和 5-15-39-616
		(74) 代理人	弁理士 藤野 清也

(54) 【発明の名称】 乳質原料から生理活性物質の製造法

(57) 【要約】

【構成】 ラクトパーオキシダーゼ、分泌性コンポーネント、ラクトフェリンを含む乳質原料を陽イオン交換体と接触させることによりこれらの成分を陽イオン交換体に吸着させた後、イオン強度及び pH の相違する水溶液または緩衝液で順次これらの成分を分離溶出させてラクトパーオキシダーゼ、分泌性コンポーネント及びラクトフェリンを製造する方法。

【効果】 簡単な操作で純度が高いラクトパーオキシダーゼ、分泌性コンポーネント及びラクトフェリンを収率よく得ることができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 乳質原料を陽イオン交換体と接触させ、ラクトパーオキシダーゼ、分泌性コンポネン、ラクトフェリンを連続的に溶出、分離、精製する工程において、(1) 該乳質原料を陽イオン交換体と接触させ、(2) イオン強度 0.2以下、pH 5 以下の水溶液または緩衝液で陽イオン交換体を洗浄し、(3) 陽イオン交換体を洗浄した後、イオン強度 0.2~0.5、pH 5 以下の水溶液または緩衝液でラクトパーオキシダーゼを選択的に溶出し、(4) ラクトパーオキシダーゼを溶出した後、イオン強度 0.1~0.5、pH 5 を越える水溶液または緩衝液で分泌性コンポネンを選択的に溶出し、(5) 分泌性コンポネン

を溶出した後、イオン強度 0.5を越え、pH 5 を越える水溶液または緩衝液でラクトフェリンを選択的に溶出することを特徴とするラクトパーオキシダーゼ、分泌性コンポネン及びラクトフェリンを分離して製造する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、乳質原料から生理活性物質を分離精製する方法に関する。オキシダーゼ（以下、LPOと略記する）、分泌性コンポネン（以下、SCと略記する）、ラクトフェリン（以下、LFと略記する）のいずれか少なくとも一つを含む乳質原料をイオン交換クロマトグラフ処理し、LPO、SC、LFを分離して製造する方法に関する。本発明の方法によって得られるLPO、SC及びLFは、多様な生理活性を有するので、医薬、化粧品、飲食品、飼料等の分野で利用される。

## 【0002】

【従来の技術】 LPO、SC及びLFは、乳等の外分泌液中に存在する糖蛋白質である。LPOは、過酸化物除去に大きな役割を果たすと共に、抗菌活性についても知られている。SCは、免疫グロブリンA（以下、IgAと略記する）と結合し、分泌型IgA（以下、SIgAと略記する）を形成する。このSIgAは、乳児にとって最も重要な感染防御因子であって、消化器官内でプロテアーゼ等によって簡単には分解されず、外来抗原に対する凝集作用等、局所感染防御に関与している。このようなSIgAのプロテアーゼ耐性は、SCによって付与されていることが知られている。LFは、静菌作用、リンパ球の増殖効果、鉄の吸収促進効果、白血球の分化調整作用、過酸化脂質の生成防止効果、抗ウイルス作用等、種々の生理機能を持つことが知られている。したがって、LPO、SC及びLFの生理作用が生体内でも有効であれば、医薬、化粧品、飲食品、飼料等の素材として大いに利用することができる。

【0003】 LPOとLFを取得する方法としては、アルギン酸ゲルを用いてLF及びLPOを同一画分中に見出す方法（特開昭61-246198）、カルボキシル基またはスルホン基を導入したデキストランを被覆したシリカ粒子を用い、塩濃度勾配によってLPOとLFを溶出する方法（特開平1-86839）、強陽イオン交換体に吸着したLPOとLFをpH 6.5で塩濃度を変化させることによって選択的に溶出させる方法（特表平3-502921）等が知られている。さらにLFとLPOを選択的に溶出する方法としては、乳またはホエーを陽イオン交換樹脂と接触させ、イオン強度0.2~0.7、pH 5 以下の水溶液または緩衝液でLPOを溶出させた後、イオン強度 0.5以上、pH 5 以上の水溶液または緩衝液でLFを溶出する方法（特開平3-109400）が知られているが、SCの溶出については言及されていない。

【0004】 一方、SCを取得する方法としては、本発明者らは、乳またはホエーを陽イオン交換樹脂と接触させ、イオン強度 0.005~0.25、pH 6~9の塩溶液で溶出する方法（特願平3-49162）を出願した。しかし、この方法によると得られるSC含有量の高い画分が得られるが、SCの単離という面からみるとSCの純度が低く、乳またはホエーのpHを6~9、電気伝導度を5mS/cm以下に調整しても70%程度の純度しか得られない。さらに純度を上げるためには、一旦LF及び／またはLPOを除去した残液を回収し、再度イオン交換クロマトグラフ処理を行わなければならない。また、SCとLFを個々に分画する方法として、DEAE-セルロース及びCM-セルロースを用いた二段階精製方法（榎本ら、『消化器と免疫』、第16巻、146~150頁、1986年発行）が知られている。しかし、このような再クロマトグラフ処理を工業的に行うと、工程が複雑となり、作業性を低下させるという問題があった。しかもこれらの方法は、乳質原料中に存在する生理活性物質のLPO、SC及びLFの3者を同時に分離精製しようとするものではなかった。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、叙上の状況に鑑みなされたものであって、LPO、SC、LFの中いずれかを少なくとも一つ以上含む乳質原料を、陽イオン交換体と接触させることによって、LPO、SC、LFを吸着させた後、個々に溶出させることにより、効率的、かつ工業的規模でLPO、SC、LFを製造する方法を提供することを課題とする。

## 【0006】

【発明を解決するための手段】 本発明者らは、従来技術のところで示したように、効率的、かつ高純度でLPO及びLFを回収する方法（特開平3-109400）を提案したが、この際に回収されるLF画分を詳細に解析したところ、LFのみならずSCが混入していることが判明した。これは、LFもSCも分子量が約80kDaの糖蛋白質

であって、その物理化学的性質がよく似ているため、電気泳動的に両者を識別することが困難であったことによる。

【0007】そこで本発明者らは、LFとSCを含む画分から両者を分画する方法について鋭意検討を行ったところ、(1) LPO、SC、LFの中いずれかを少なくとも一つ以上含む乳質原料を陽イオン交換体と接触させ、(2) イオン強度 0.2以下、pH5 以下の水溶液または緩衝液で陽イオン交換体を洗浄し、(3) 陽イオン交換体を洗浄した後、イオン強度 0.2~0.5、pH5 以下の水溶液または緩衝液でLPOを選択的に溶出し、(4) LPOを溶出した後、イオン強度 0.1~0.5、pH5 を越える水溶液または緩衝液でSCを選択的に溶出し、(5) SCを溶出した後、イオン強度 0.5を越え、pH5 を越える水溶液または緩衝液でLFを選択的に溶出することによってLPO、SC及びLFを分離できることを見出し、本発明をなすに至った。

【0008】本発明で用いることのできる乳質原料としては、ヒト、ウシ、水牛、ヒツジ、ヤギ等の哺乳類由来の乳及びホエーを挙げることができる。好ましくは、熱処理条件の緩やかなものを用いる。また、脱脂粉乳、全脂粉乳、ホエー粉、ホエー蛋白を75%以上含むWPC粉（ホエー蛋白質濃縮物）、あるいはホエー蛋白質を90%以上含むWPI粉（ホエー蛋白質分離物）を水または緩衝液に還元したものでもよい。さらに、等電点沈澱によってカゼインを除去したり、レンネットによってカゼインカードを排除した上清、あるいはチーズ製造時に排出されるチーズホエーも利用することができる。これらの乳質原料は、予めクラリファイヤー、マイクロフィルトレーション、濾過等の操作によって沈澱物を除去しておくことが望ましい。このようにすると、蛋白質のイオン交換体への吸着効率を高め、さらに純度を高めることができる。本発明における乳質原料は、ラクトパーオキシダーゼ、分泌性コンポーネント、ラクトフェリンの中いずれかを少なくとも一つ含むものが用いられる。

【0009】組成物中のLPO、SC、LFを高収率で得るためには、陽イオン交換体と接触させる乳質原料のpHが5~9のものが望ましい。乳のpHが5より低い場合は、カゼインの沈澱が生じて好ましくない。また、ホエーのpHが6より低い場合は、例えば、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、血清アルブミン、免疫グロブリン等、LPO、SC、LF以外の夾雑物も陽イオン交換体に吸着するので、結果的にLPO、SC、LFの回収量と純度が低下する。乳またはホエーのpHが9より高い場合は、陽イオン交換体に吸着するLPO、SC、LFの量が低下する。

【0010】LPO、SC、LFの中いずれかを少なくとも一つを含む乳質原料は、特に脱塩処理を行ってイオン強度を調整しなくてもLPO、SC、LFを選択的に溶出させることが可能であるが、電気伝導度を5mS/cm

以下になるまで脱塩すると、特にSCの陽イオン交換体に対する吸着量を高くすることができる。

【0011】本発明でLPO、SC、LFの吸着に用いる陽イオン交換体としては、架橋型の多糖類やセルロース、あるいはアクリルアミド樹脂にカルボキシル基、スルホン基、リン酸基等を導入したもの、または樹脂と交換基の間に何らかのスペーサーを導入したもの等があり、具体的にはカルボキシメチル基を導入したCM-セルロファインC-500（生化学工業（株）製）、スルホン基を導入したスルホン化キトパール（富士紡績（株）製）、スルホプロピル基を導入したSP-トヨパール550C（東ソー（株）製）、S-セファロースファーストフロー（ファルマシア社製）、リン酸基を導入したホスホセルロース（ファルマシア社製）等を例示することができる。LPO、SC、LFの中いずれかを少なくとも一つ含む乳質原料を陽イオン交換体に接触させる方法としては、タンク内で両者を接触させる方法、陽イオン交換体を充填したカラムに通液する方法、あるいは回転型カラム反応器を用いる方法（特開平2-138295）等がある。特に、大量調製する際には回転型カラム反応器を用いると効率的である。

【0012】LPO、SC、LFの中いずれかを少なくとも一つ含む乳質原料と陽イオン交換体を接触させる温度は特に限定されないが、通常は、4℃以上60℃未満の範囲で行う。4℃未満の温度では、乳質原料の凍結、粘度上昇、脂肪分離等が生じる。60℃以上の温度では、LPO、SC、LFが変性する可能性がある。なお、15℃以上の温度では微生物の繁殖が著しいので、大量処理を行う場合は温度15℃未満で処理することが望ましい。

【0013】また、乳質原料と陽イオン交換体とは、乳質原料1kgに対して陽イオン交換体を1~100gの目安で混合し、15分間~15時間程度攪拌して処理を行うこともできる。

【0014】LPO、SC、LFの溶出は、以下のように行う。まず、イオン強度が0.2以下でpHが5以下の水溶液または緩衝液で該陽イオン交換体を洗浄し、陽イオン交換体の間に詰まっている不純物を除去する。この際、イオン強度が0.2及びpHが5を越えると陽イオン交換体に吸着しているLPOが溶出してくる恐れがあるので、イオン強度が0.05~0.15及びpHが2.5~4.5で処理を行うことが好ましい。この洗浄処理に先立って、イオン強度が0.1以下でpHが5を越える水溶液または緩衝液でLPO、SC、LFを吸着した陽イオン交換体を予備洗浄してもよい。この洗浄には、水または温湯を用いてもよい。この予備洗浄を十分行っておくと、その後の洗浄に使用するイオン強度が0.2以下でpHが5以下の水溶液または緩衝液の液量を減少させることができるので、製造コストを考慮すると有利である。これらの洗浄に用いる水溶液または緩衝液は特に限定されるものではなく、イオン強度が0.2以下でpHが5以下のものであれば

よい。具体的には、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の有機酸緩衝液、あるいはグリシン緩衝液、ジメチルグルタル酸緩衝液等を例示することができる。リン酸緩衝液も使用可能であるが、pHが5以下では緩衝能が低下する。

【0015】次に、該陽イオン交換体に吸着しているLPO、SC、LFを選択的に分離して溶出させる。本発明では特定のイオン強度とpHを持つ洗浄液で洗浄を行った後、さらに溶出液として特定のイオン強度とpHを持つ水溶液または緩衝液を用いるので、一度のクロマトグラフ処理によってLPO、SC、LFを効率よく分離し、溶出することができる。一方、LPO、SCおよびLFを同時に含む画分を得る場合にはpH5を越え、イオン強度0.5を越える水溶液又は緩衝液で溶出することで得ることができる。

【0016】陽イオン交換体に吸着しているLPOを溶出させるには、イオン強度が0.2~0.5でpHが5以下、好ましくは、イオン強度が0.2~0.4でpHが3~5の水溶液または緩衝液を用いる。イオン強度が0.2以下では、LPOが溶出できないか、溶出しても極めて少量である。イオン強度が0.5以上になるとpHが5以下であっても同時にSC、LFが溶出するため、LPOの純度が低下し、さらには、SC、LFの回収量も低下する。一方、pHが5以上になるとイオン強度が0.2以下であっても少量のSC、LFが同時に溶出するので、LPOの純度が低下する。ここで用いる水溶液または緩衝液も特に限定されるものではなく、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の有機酸緩衝液、あるいはグリシン緩衝液、ジメチルグルタル酸緩衝液等を用いることができ、イオン強度を高めるためには食塩等を添加すればよい。このようにして得られたLPOの純度は50%以上であり、通常の処理でも純度80%以上のLPOを容易に得ることができる。又、pH5を越え、イオン強度0.1~0.5の水溶液又は緩衝液で溶出すると、主としてLPOとSCの両者を含む画分が得られる。

【0017】LPOを溶出した後、陽イオン交換体に吸着しているSCを溶出させるには、イオン強度が0.1~0.5、好ましくは0.3~0.5で、pHが5を越え、好ましくは6~8の水溶液または緩衝液を用いる。pHが5以下

では、SCとLFを分別回収することが難しく、SCの純度を低下させる。また、イオン強度が0.5を越えると、LFの混入が多く、SCの純度を低下させる。ここで用いる水溶液または緩衝液も特に限定されるものではなく、リン酸緩衝液、イミダゾール緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液等を例示することができる。このようにすると純度80%以上のSCを容易に得ることができる。又、pH5を越え、イオン強度0.5を越える水溶液又は緩衝液で溶出するとSCとLFを同時に含む画分を得ることができる。

【0018】LPO及びSCを溶出した後、陽イオン交換体に吸着しているLFを溶出させるには、イオン強度が0.5を越え、好ましくは0.7~2.0で、pHが5を越え、好ましくは6~8の水溶液または緩衝液を用いる。イオン強度が0.5以下ではLFの溶出量が少なく、また、pHが5以下でもLFの溶出量が少ない。ここで用いる水溶液または緩衝液も特に限定されるものではなく、水に食塩を溶解してイオン強度を0.5を越えるように調整した水溶液やクエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、マレイン酸緩衝液等の有機酸緩衝液、あるいはリン酸緩衝液、イミダゾール緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液等を例示することができる。このようにして得られたLFの純度は70%以上であり、通常の処理でも純度80%以上のLFを容易に得ることができる。

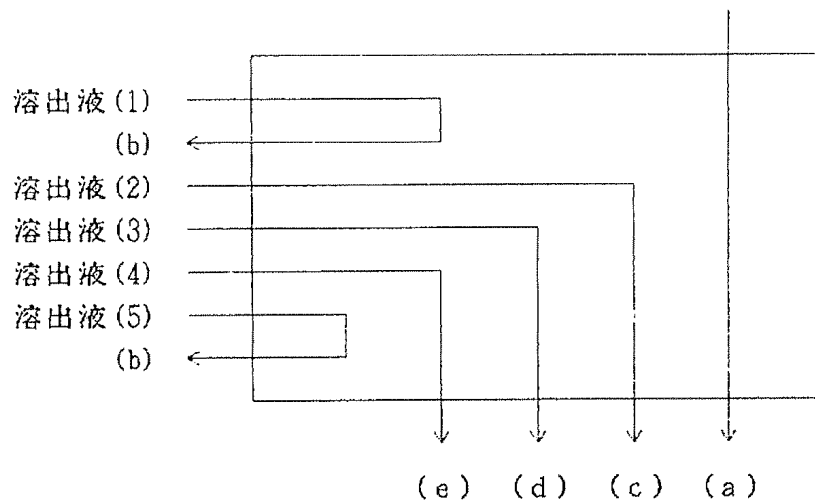
【0019】また、LPO、SC、LF溶出用の水溶液または緩衝液を通液する前に、イオン強度0.1未満で溶出液と同一pHに調整した水溶液または緩衝液を通液することができる。この操作は煩雑になるが、陽イオン交換体に残存している塩類を洗い流すことができると同時に陽イオン交換体のpHを目的のpHに平衡化する効果がある。

【0020】LPO、SC、LFの吸着及び溶出に用いた陽イオン交換体は、イオン強度が0.25より高い水溶液または緩衝液で洗浄した後、水で十分洗浄することにより、再度利用することが可能となる。

【0021】本発明の工程の概念を表1に示す。

【表1】

## 乳質原料物質



溶出液	イオン強度	p H
( 1 )	<0.2	≦ 5
( 2 )	0.2~0.5	≦ 5
( 3 )	0.1~0.5	> 5
( 4 )	>0.5	> 5
( 5 )	≧0.25	

- ( a ) 脱 L P O、S C、L F 乳またはホエー  
 ( b ) 廃棄液  
 ( c ) L P O 溶出画分  
 ( d ) S C 溶出画分  
 ( e ) L F 溶出画分

【0022】得られた L P O、S C、L F は、必要に応じて、濃縮、脱塩、乾燥を行う。濃縮は、真空濃縮法、限外濾過法、逆浸透圧濾過法等を用いて行うことができる。脱塩は、限外濾過膜、透析膜、電気透析膜、あるいはイオン交換樹脂、ゲル濾過用ゲル等を用いて行うことができる。乾燥は、凍結乾燥法や噴霧乾燥法等を用いて行うことができる。

【0023】このようにして製造した溶液あるいは乾燥させた L P O、S C 中には免疫グロブリン G が不純物として存在する。これらの蛋白質をさらに高度に精製するためには、プロテイン G やプロテイン A など固定化した免疫グロブリン G アフィニティー担体を用いたクロマトグラフが有効である。この方法を用いると少なくとも純度 90% 以上の L P O、S C を得ることができる。

【0024】以下に実施例を示して本発明を具体的に説明する。

【実施例 1】チーズホエー 600kg を分画分子量 20,000 の限外濾過膜を用いて 2mS/cm になるまで脱塩した。こうして得られたチーズホエー (pH 6.4) 中には、L P O 22g、S C 17g、L F 48g がそれぞれ含まれていた。このチーズホエーと S P-トヨパール 550C (東ソー (株) 製) 6kg をタンク内で接触させ、6 時間混合攪拌することによって L P O、S C、L F を陽イオン交換体に吸着させた後、上清をデカンテーションで除去し、充填層型カラム (直径 20cm×高さ 29cm) に充填した。

【0025】カラムを水で十分洗浄し、5mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した後、0.08M 塩化ナトリウムを含む 5mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) で洗浄した。L P O の溶出は 0.3M 塩化ナトリウムを含む 5mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) で行った。S C の溶出は、L P O を溶出した後のカラムを 0.01M 塩化ナトリウムを含む 10mM クエン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した後、0.4M 塩化ナトリウム

ム水溶液で行った。LFの溶出は、1M 塩化ナトリウム水溶液で行った。

【0026】溶出したLPO、SC、LFは、それぞれ、分画分子量10,000の限外濾過膜を用いて濃縮、脱塩した後、凍結乾燥を行い、純度87%のLPO18g、純度90%のSC15.3g、純度92%のLF35gを得た。なお、純度の測定はSDS-PAGEで行った。

【0027】

【実施例2】チーズホエー200kg に対し、S-セファロース ファーストフロー（ファルマシア社製）2kg をタンク内で接触させ、15時間混合攪拌することによってLPO、SC、LFを陽イオン交換体に吸着させた。上清をデカンテーションで除去したのち、陽イオン交換体を充填層カラム（直径20cm×高さ29cm）に充填した。

【0028】カラムを水で十分洗浄し、10mMクエン酸緩衝液（pH 4.0）で平衡化した後、0.15M 塩化ナトリウムを含む10mMクエン酸緩衝液（pH 4.0）で洗浄した。LPOの溶出は0.4M塩化ナトリウムを含む10mMクエン酸緩衝液（pH 4.0）で行った。SCの溶出は、LPOを溶出した後のカラムを10mMクエン酸緩衝液（pH 6.5）で平衡化した後、0.4M塩化ナトリウム水溶液で行った。LFの溶出は、1M 塩化ナトリウム水溶液で行った。

【0029】溶出したLPO、SC、LFは、それぞれ、分画分子量 10,000 の限外濾過膜を用いて濃縮、脱塩した後、凍結乾燥を行い、純度90%のLPO12g、純度85%のSC 8g、純度95%のLF17gを得た。

【0030】

【実施例3】スルホン化キトパール（富士紡績（株）製）1.5Lを充填した回転型カラム反応器（東京理化工機（株）製）に、生脱脂乳 400kg（pH 6.8）を 200 L/h の流速で3時間循環通液した。この回転型カラム反応器内を40℃の温水で十分に洗浄した後、0.07M 塩化カリウムを含む5mM酢酸緩衝液（pH 4.0）で洗浄した。LPOの溶出は、塩酸でpHを 4.0に調整した 0.2M 塩化カリウム水溶液で行った。SCの溶出は、LPOを溶出した回転型カラム反応器内を水で十分洗浄し、さらに0.01M トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）で洗浄した後、0.3M 塩化カリウム水溶液で行った。LFの溶出は、0.75M 塩化カリウムを含む重炭酸ナトリウム緩衝液（pH 7.5）で行った。

【0031】溶出したLPO、SC、LFは、それぞれ、分画分子量50,000の限外濾過膜を用いて1.5Lとなる

まで濃縮し、電気透析膜を用いて電気伝導度が 0.2mS/cmとなるまで脱塩した後、凍結乾燥を行い、純度85%のLPO19.7g、純度88%のSC13.8g、純度94%のLF39gを得た。なお、純度の測定はSDS-PAGEで行った。

【0032】

【実施例4】WPC15gを 250MLの水に溶解し、pHを7.5に調整した後、CM-セルロファイン（生化学工業（株）製）10gを充填したカラム（直径 1.5cm×高さ12cm）に3ML/min の流速で通液した。

【0033】カラムを0.005Mリン酸緩衝液（pH 7.5）で十分洗浄し、さらに0.05M 塩化ナトリウムを含む 0.005M クエン酸緩衝液（pH 4.5）で洗浄した。LPOの溶出は、0.25M 塩化ナトリウムを含む 0.005M クエン酸緩衝液（pH 4.5）で行った。SCの溶出は0.15M 塩化ナトリウムを含む0.01M リン酸緩衝液（pH 7.0）で行った。LFの溶出は、0.7M 塩化ナトリウムを含む0.01M リン酸緩衝液（pH 7.0）で行った。

【0034】溶出したLPO、SC、LFは、それぞれ、脱塩用のイオン交換樹脂アンバーライトMB-3（オルガノ（株）製）を用いて電気伝導度 0.5mS/cmとなるまで脱塩した後、濃縮し、凍結乾燥を行い、純度91%のLPO 5mg、純度96%のSC 2mg、純度94%のLF 8mgを得た。なお、純度の測定はSDS-PAGEで行った。

【0035】

【発明の効果】本発明の方法によってLPO、SC、LFを分離採取すると、従来法に見られるように再度クロマトグラフ処理を行ってLPO、SC、LFを分離、精製する必要がなく、工程を簡略化することができる。すなわち、本発明によれば、一回のクロマトグラフ処理によって、純度80%以上のLPO、SC、LFを回収することができる。さらに、限外濾過工程を付すことによって、僅かに含まれる低分子の不純物を除去することができ、最終的には、純度85%以上のLPO、SC、LFを得ることができる。このように工程が簡略化できると、純度が高いこと、また、回収率が高いことから、生産コストを安価にすることが可能となるばかりでなく、感染予防用の食品や医薬品、貧血予防の食品や医薬品、あるいは治療剤として利用することが可能である。

【手続補正書】

【提出日】平成5年1月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、乳質原料から生理活性物質を分離精製する方法に関する。ラクトパーオキシダーゼ（以下、LPOと略記する）、分泌性コンゴネント（以下、SCと略記する）、ラクトフェリン（以下、LFと略記する）のいずれか少なくとも一つを含む乳質原

料をイオン交換クロマトグラフ処理し、LPO、SC、LFを分離して製造する方法に関する。本発明の方法によって得られるLPO、SC及びLFは、多様な生理活性を有するので、医薬、化粧品、飲食品、飼料等の分野で利用される。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】組成物中のLPO、SC、LFを高収率で得るためには、陽イオン交換体と接触させる乳質原料のpHが4～9のものが望ましい。カゼインを含有する乳のpHが5より低い場合は、カゼインの沈澱が生じて好ましくない。また、ホエーのpHが4より低い場合は、例えば、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、血清アルブミン、免疫グロブリン等、LPO、SC、LF以外の夾雑物も陽イオン交換体に吸着するので、結果的にLPO、SC、LFの回収量と純度が低下する。さらに、LPOの活性はpH5以下で低下するので好ましくない。乳またはホエーのpHが9より高い場合は、陽イオン交換体に吸着するLPO、SC、LFの量が低下する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】LPO、SC、LFの中いずれかを少なくとも一つを含む乳質原料は、特に脱塩処理を行ってイオン強度を調整しなくてもLPO、SC、LFを吸着させることが可能であるが、電気伝導度を5mS/cm以下になるまで脱塩すると、特にSCの陽イオン交換体に対する吸着量を高くすることができる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】また、乳質原料と陽イオン交換体とは、乳質原料1kgに対して陽イオン交換体を0.2～100gの目安で混合し、15分間～15時間程度攪拌して処理を行うこともできる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】LPO、SC、LFの溶出は、以下のように行う。まず、イオン強度が0.2以下でpHが5以下

の水溶液または緩衝液で該陽イオン交換体を洗浄し、陽イオン交換体の間に詰まっている不純物を除去する。この際、イオン強度が0.2及びpHが5を越えると陽イオン交換体に吸着しているLPOが溶出してくる恐れがあるので、イオン強度が0.05～0.15及びpHが4～5で処理を行うことが好ましい。この洗浄処理に先立って、イオン強度が0.1以下でpHが5を越える水溶液または緩衝液でLPO、SC、LFを吸着した陽イオン交換体を予備洗浄してもよい。この洗浄には、水または温湯を用いてもよい。この予備洗浄を十分行っておくと、その後の洗浄に使用するイオン強度が0.2以下でpHが5以下の水溶液または緩衝液の液量を減少させることができるので、製造コストを考慮すると有利である。これらの洗浄に用いる水溶液または緩衝液は特に限定されるものではなく、イオン強度が0.2以下でpHが5以下のものであればよい。具体的には、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の有機酸緩衝液、あるいはグリシン緩衝液、ジメチルグルタル酸緩衝液等を例示することができる。リン酸緩衝液も使用可能であるが、pHが5以下では緩衝能が低下する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】陽イオン交換体に吸着しているLPOを溶出させるには、イオン強度が0.2～0.5でpHが5以下、好ましくは、イオン強度が0.2～0.4でpHが3～5の水溶液または緩衝液を用いる。イオン強度が0.2以下では、LPOが溶出できないか、溶出しても極めて少量である。イオン強度が0.5以上になるとpHが5以下であっても同時にSC、LFが溶出するため、LPOの純度が低下し、さらには、SC、LFの回収量も低下する。一方、pHが5以上になるとイオン強度が0.2以下であっても少量のSC、LFが同時に溶出するので、LPOの純度が低下する。ここで用いる水溶液または緩衝液も特に限定されるものではなく、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の有機酸緩衝液、あるいはグリシン緩衝液、ジメチルグルタル酸緩衝液等を用いることができ、イオン強度を高めるためには食塩等を添加すればよい。このようにして得られたLPOの純度は最低でも50%以上であり、通常は純度80%以上のLPOを容易に得ることができる。又、pH5を越え、イオン強度0.1～0.5の水溶液又は緩衝液で溶出すると、主としてLPOとSCの両者を含む画分が得られる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】



【0018】LPO及びSCを溶出した後、陽イオン交換体に吸着しているLFを溶出させるには、イオン強度が0.5を越え、好ましくは0.7～2.0で、pHが5を越え、好ましくは6～8の水溶液または緩衝液を用いる。イオン強度が0.5以下ではLFの溶出量が少なく、また、pHが5以下でもLFの溶出量が少ない。ここで用いる水溶液または緩衝液も特に限定されるものではなく、水に食塩を溶解してイオン強度を0.5を越えるように調整した水溶液やクエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、マレイン酸緩衝液等の有機酸緩衝液、あるいはリン酸緩衝液、イミダゾール緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液等を例示することができる。このようにして得られたLFの純度は最低でも70%以上であり、通常は純度80%以上のLFを容易に得ることができる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正内容】

【0030】

【実施例3】スルホン化キトパール（富士紡績（株）製）1.5Lを充填した回転型カラム反応器（東京理化学器械（株）製）に、生脱脂乳400kg（pH6.8）を200L/hの流速で3時間循環通液した。この回転型カラム反応器を樹脂と共に40℃の温水で十分に洗浄した後、0.07M塩化カリウムを含む5mM酢酸緩衝液（pH4.0）で洗浄した。LPOの溶出は、塩酸でpHを4.0に調整した0.2M塩化カリウム水溶液で行った。SCの溶出は、LPOを溶出した回転型カラム反応器を樹脂と共に水で十分に洗浄し、さらに0.01Mトリス塩酸緩衝液（pH7.5）で洗浄した後、0.3M塩化カリウム水溶液で行った。LFの溶出は、0.75M塩化カリウムを含む重炭酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）で行った。

【手続補正書】

【提出日】平成5年1月28日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項1】乳質原料を陽イオン交換体と接触させ、ラクトパーオキシダーゼ、分泌性コンポネント、ラクトフェリンを連続的に溶出、分離、精製する工程において、（1）該乳質原料を陽イオン交換体と接触させ、（2）イオン強度0.2未満、pH5以下の水溶液または緩衝液で陽イオン交換体を洗浄し、（3）陽イオン交換体を洗浄した後、イオン強度0.2～0.5、pH5以下の水溶液または緩衝液でラクトパーオキシダーゼを選択的に溶出し、（4）ラクトパーオキシダーゼを溶出した後、イオン強度0.1～0.5、pH5を越える水溶液または緩衝液で分泌性コンポネントを選択的に溶出し、（5）分泌性コンポネントを溶出した後、イオン強度0.5を越え、pH5を越える水溶液または緩衝液でラクトフェリンを選択的に溶出することを特徴とするラクトパーオキシダーゼ、分泌性コンポネント及びラクトフェリンを分離して製造する方法。

は緩衝液で陽イオン交換体を洗浄し、（3）陽イオン交換体を洗浄した後、イオン強度0.2～0.5、pH5以下の水溶液または緩衝液でラクトパーオキシダーゼを選択的に溶出し、（4）ラクトパーオキシダーゼを溶出した後、イオン強度0.1～0.5、pH5を越える水溶液または緩衝液で分泌性コンポネントを選択的に溶出し、（5）分泌性コンポネントを溶出した後、イオン強度0.5を越え、pH5を越える水溶液または緩衝液でラクトフェリンを選択的に溶出することを特徴とするラクトパーオキシダーゼ、分泌性コンポネント及びラクトフェリンを分離して製造する方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A61K 37/14	ABY			
	ADD	8314-4C		
	ADY			
37/50	ADZ	8314-4C		
39/395		Y 8413-4C		
C07K 3/20		7731-4H		
C12N 9/08		7823-4B		